

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
7. Februar 2002 (07.02.2002)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer

WO 02/10207 A2

- (51) Internationale Patentklassifikation⁷: C07K 14/195 (74) Anwalt: GRÜNECKER, KINKELDEY, STOCKMAIR
& SCHWANHÄUSSER; Maximilianstrasse 58, 80538
München (DE).
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP01/08715
- (22) Internationales Anmeldedatum:
27. Juli 2001 (27.07.2001)
- (81) Bestimmungsstaaten (*national*): AE, AG, AL, AM, AT,
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR,
CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE,
GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ,
LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN,
MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI,
SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU,
ZA, ZW.
- (25) Einreichungssprache: Deutsch
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (30) Angaben zur Priorität:
100 36 745.3 27. Juli 2000 (27.07.2000) DE
100 48 383.6 29. September 2000 (29.09.2000) DE
- (84) Bestimmungsstaaten (*regional*): ARIPO-Patent (GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW),
eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,
TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK,
ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR),
OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW,
ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme
von US): MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT ZUR
FÖRDERUNG DER WISSENSCHAFTEN E.V.
[DE/DE]; Generalverwaltung, Hofgartenstrasse 8, 80539
München (DE).
- Veröffentlicht:
— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu
veröffentlichen nach Erhalt des Berichts
- (72) Erfinder; und
- (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): OESTERHELT,
Dieter [DE/DE]; Werdenfelsstrasse 17, 81377 München
(DE). HAMPP, Norbert [DE/DE]; Schillerstrasse 19,
35287 Amöneburg-Rossdorf (DE). PFEIFFER, Matthias
[DE/DE]; Deutschhausstrasse 46, 35037 Marburg (DE).
- Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen
Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on
Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe
der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: PROTON-TRANSLOCATING RETINAL PROTEIN

(54) Bezeichnung: PROTONEN-TRANSLOZIERENDES RETINALPROTEIN

(57) Abstract: The invention relates to proton-translocating retinal proteins, which have a slower photocycle in comparison to the wild type and whose all *trans* retinal content in both the light-adapted and dark-adapted states does not differ by more than 10 %. The invention also relates to a photochromic composition and to the use of both the proton-translocating retinal proteins and the photochromic composition.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft Protonen-translozierende Retinalproteine, die einen gegenüber dem Wildtyp verlangsamt Photozyklus aufweisen und deren all-*trans*-Retinal-Gehalt im Hell und im Dunkel-adaptierten Zustand um nicht mehr als 10% voneinander abweicht. Die Erfindung betrifft weiterhin eine photochrome Zusammensetzung und die Verwendung der Protonen-translozierenden Retinalproteine sowie der photochromen Zusammensetzung.

WO 02/10207 A2

Protonen-translozierendes Retinalprotein

Die Erfindung betrifft ein Protonen-translozierendes Retinalprotein, eine das Protonen-translozierende Retinalprotein enthaltende photochrome Zusammensetzung und die Verwendung des Protonen-translozierendes Retinalproteins und der Zusammensetzung.

Halobakterien sind Archaea, die neben den Bacteria und Eukarya eine dritte Domäne des Lebens bilden. Archaea verdanken ihren Namen den ungewöhnlichen Biotopen, in denen sie vorkommen. Sie leben häufig unter „archaischen“ Bedingungen, d.h. bei extremen Temperaturen, Salzkonzentrationen oder pH-Werten, wie sie auf der frühen Erdoberfläche geherrscht haben könnten.

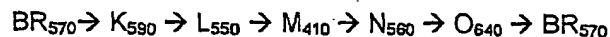
Die halophilen Archaea umfassen 9 Genera (z.B. *Halobacterium*, *Haloferax*, *Natronomonas*, etc.) und sind durchwegs extremophil, d.h. sie leben in Salzlösungen, deren Konzentration von 2 molar bis zur Sättigung reicht und die manchmal noch zusätzlich alkalische pH-Werte bis zu pH 11 aufweisen. In der Natur sind die Halobakterien Teil eines komplexen Ökosystems. Die bei permanenter Sonneneinstrahlung wachsende Salinität in Salzgewinnungsanlagen oder die Bedingungen im Toten Meer und anderen natürlichen hypersalinen Gewässern erlauben nach den jährlichen Regengüssen zunächst das photolithotrophe Wachstum der halotoleranten Grünalge *Dunaliella parva* bis zu einem Salzgehalt von etwa 12%. Nach Überschreiten der für sie optimalen Bedingungen stirbt *Dunaliella* ab und ermöglicht das massive Wachstum von halophilen Archaea, die auf Grund ihres Carotinoidgehalts oft zu einer Rotfärbung dieser Gewässer führen.

Die halophilen Archaea besitzen neben Fermentation, aerober und anaerober Atmung eine zusätzliche Möglichkeit der Energieumwandlung, die unter den Archaea einmalig ist: sie können mittels Retinal-abhängiger Photosynthese Energie aufnehmen und umwandeln. Im Gegensatz zu der grünen, Chlorophyll-abhängigen Photosynthese ist hier nur ein einziges

Protein an der Energieaufnahme und -umwandlung beteiligt, nämlich ein lichtgetriebenes Protonen-translozierendes Retinalprotein.

Das bekannteste Beispiel eines solchen Protonen-translozierenden Retinalproteins ist die archaebakterielle Protonenpumpe Bakteriorhodopsin (BR), die die Lichtenergie direkt zur Erzeugung eines elektrochemischen Protonengradienten, der in chemische Energie gewandelt wird, ausnutzt. Bakteriorhodopsin ist ein intrinsisches Membranprotein mit einem Molekulargewicht von ca. 26 kDa. Die Polypeptidkette durchquert die Membran siebenmal und bildet so eine Sekundärstruktur von sieben helikalen Transmembranbereichen. An die Seitenkette eines Lysins der siebenten Helix im Inneren des Proteins ist kovalent ein Retinal (Vitamin A Aldehyd) gebunden. Die entstandene $\text{CH}=\text{N}$ -Gruppe wird Schiff'sche Base (SB) genannt und ist im Ausgangszustand am Stickstoff protoniert (SBH). Einen Überblick über das Bakteriorhodopsin gibt die Arbeit von Haupts et al. (Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 28, 367-99, 1999).

Der Chromophor des BR absorbiert gelbgrünes Licht maximal bei 570 nm, so dass BR dem menschlichen Auge violett erscheint. Nach Absorption eines Photons erfährt das Protein chemische und strukturelle Änderungen, die zu unterscheidbaren, spektroskopisch messbaren Intermediaten führen. Sie werden mit den Buchstaben K, L, M, N und O bezeichnet und jeweils mit der Wellenlänge der maximalen Absorption indiziert. Der Zyklus kann vereinfacht folgendermaßen beschrieben werden:



Bakteriorhodopsin ist das bisher einzige Retinalprotein, das in der Natur in Form eines zweidimensionalen Kristalles vorkommt. Im Bakterium sind die Kristalle in der sogenannten Purpurmembran lokalisiert. Die Organisation in der Purpurmembran stabilisiert das Protein in einem solchen Maße, dass es für eine Reihe technischer Anwendungen vorgeschlagen worden ist (zusammengefaßt in Oesterhelt et al., Quarterly Rev. Biophysics 24, 425-478, 1991). Dabei können die bei Belichtung auftretenden Änderungen des pH-Wertes der Lösung, der elektrischen Spannung und der Farbe genutzt werden.

So ist der Farbwechsel vom Violett des Bakteriorhodopsins im Ausgangszustand BR₅₇₀ zum Gelb im Intermediat M₄₁₀ die Basis für Anwendungen in der optischen Informationstechnologie. Der Zerfall des Intermediates M₄₁₀, das eine Lebensdauer von wenigen Millisekunden hat, ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt in diesem Zyklus. Die Lichtintensität und die thermische Zerfallskonstante des M-Intermediats bestimmen im Photozyklus das Verhältnis der Farben Violett und Gelb.

Der Retinylidenteil des Bakteriorhodopsins liegt im Dunkeln als eine Mischung von *all-trans*, *15-anti* und *13-cis*, *15-syn* Konfiguration im Verhältnis von etwa 60:40 vor. Es ist ausschließlich die *all-trans* Form des Chromophors, die den physiologischen Prozeß der Protonentranslokation vermittelt und das gelbe Intermediat M₄₁₀ durchläuft („*trans*-Zyklus“). Zwar führt auch die Absorption von Photonen in der *13-cis* Konfiguration zu einem Zyklus von Farbänderungen, dem „*cis*-Zyklus“, dieser unterscheidet sich jedoch vom „*trans*-Zyklus“ darin, dass kein gelbes M-ähnliches Intermediat gebildet wird. Aus dem „*cis*-Zyklus“ springt das Molekül bei Belichtung mit einer sehr kleinen Wahrscheinlichkeit in den „*trans*-Zyklus“ hinüber. Dieser Wechsel vom „*cis*-“ in den „*trans*-Zyklus“ wird als Helladaptation der Dunkel-adaptierten Form bezeichnet. In der Praxis bedeutet das, dass nach Dunkelaufbewahrung einer Probe (Dunkeladaptation) eine anfängliche Belichtung nur zu etwa 60% des theoretisch möglichen M-Intermediats führt. Durch weitere Belichtung adaptiert die Probe nach und nach (Helladaptation), so dass schließlich alle Moleküle in den „*trans*-Zyklus“ überführt sind und das M-Intermediat durchlaufen.

Der Wechsel der Moleküle vom „*cis*-“ in den „*trans*-Zyklus“ führt zu einer Verschiebung des Absorptionsmaximums um mehrere nm und bedeutet einen erheblichen Nachteil für die Verwendung von Bakteriorhodopsinen bei der Herstellung photochromer Erzeugnisse, z.B. optischer Filme oder Druckfarben.

Es wäre deshalb wünschenswert, Protonen-translozierende Retinalproteine herzustellen, deren Absorptionsmaximum im Dunkel-adaptierten Zustand dem im Hell-adaptierten Zustand möglichst genau entspricht. Darüberhinaus wäre es von Vorteil, wenn die Stabilität

des M-Intermediates erhöht werden könnte, um den Farbwechsel der im „*trans*-Zyklus“ vorliegenden Moleküle von Violett nach Gelb möglichst genau beobachten zu können.

Erfindungsgemäß wird nunmehr ein Protonen-translozierendes Retinalprotein bereitgestellt, das aus der Gruppe von:

- (i) Muteinen eines natürlichen Protonen-translozierenden Retinalproteins aus halophilen Archaeobakterien, die einen verlangsamten Photozyklus aufweisen (Typ 1-Mutation) und deren *all-trans* Retinal-Gehalt im Hell- und Dunkel-adaptierten Zustand um nicht mehr als 10% voneinander abweicht (Typ 2-Mutation) und/oder
- (ii) Homologen der Muteine (i) mit verlangsamten Photozyklus, deren Retinalisomeren-Zusammensetzung im Hell- und Dunkel-adaptierten Zustand um nicht mehr als 10% voneinander abweicht

ausgewählt ist.

Unter einem Mutein werden durch eine Substitution, Deletion oder Insertion modifizierte Protonen-translozierende Retinalproteine verstanden. Muteine können ein oder mehrere Mutationen aufweisen. Typ 1-Mutationen sind dabei Mutationen, die zu einer Verlangsamung des Photozyklus im Vergleich zum natürlichen Retinalprotein aus *Halobacterium salinarum* (SEQ ID No.1) führen. Die Messung des Photozyklus erfolgt dabei wie z.B. von Miller & Oesterheld, Biochem. Biophys. Acta 1020, 57-64, 1990, beschrieben. Typ 2-Mutationen führen zu einer im Vergleich zum natürlichen Retinalprotein aus *Halobacterium salinarum* (SEQ ID No.1) erhöhten Konstanz des *all-trans*-Retinal-Gehalts im Hell- und im Dunkel-adaptierten Protein. Der *all-trans*-Retinal-Gehalt wird dabei bestimmt, wie von Tittor et al., Biophys. J. 67, 1682-1690, 1994, beschrieben. Die Prozentangabe bezieht sich auf den Gesamtgehalt der mittels des erwähnten Verfahrens bestimmbaren Retinalisomere. Normalerweise werden Typ 1-Mutationen und Typ 2-Mutationen verschiedene Aminosäuren betreffen. Es ist jedoch auch möglich, dass eine einzelne Mutation beide gewünschten Wirkungen aufweist und daher gleichzeitig als Typ 1- und als Typ 2-Mutation zu klassifizieren ist. Soweit natürlich auftretende, archaeobakterielle Protonen-translozierende Retinalproteine im Vergleich zu dem bekanntesten Protonen-translozierenden Retinalprotein, d.h.,

Bakteriorhodopsin aus *Halobacterium salinarum* (SEQ ID No.1), einen verlangsamten Photozyklus aufweisen und ihr all-*trans*-Retinal-Gehalt im Hell- und im Dunkel-adaptierten Zustand um nicht mehr als 10% voneinander abweicht, gelten sie im Rahmen der vorliegenden Erfindung ebenfalls als Muteine.

Der dem Fachmann bekannte Ausdruck "Homolog" bezeichnet eine Verwandtschaft zwischen zwei oder mehr Peptiden, Polypeptiden oder Proteinen, der durch die Übereinstimmung zwischen den Sequenzen mittels bekannter Verfahren, z. B. der computergestützten Sequenzvergleiche (Basic local alignment search tool, S.F. Altschul et al., J. Mol. Biol. 215 (1990), 403-410), bestimmt werden kann. Der Prozentsatz der Identität ergibt sich aus dem Prozentsatz identischer Bereiche in zwei oder mehr Sequenzen unter Berücksichtigung von Lücken oder anderen Sequenzbesonderheiten. In der Regel werden spezielle Computerprogramme mit Algorithmen eingesetzt, die den besonderen Anforderungen Rechnung tragen.

Bevorzugte Verfahren zur Bestimmung der Homologie erzeugen zunächst die größte Übereinstimmung zwischen den untersuchten Sequenzen. Computerprogramme zur Bestimmung der Identität zwischen zwei Sequenzen umfassen, sind jedoch nicht eingeschränkt auf das GCG Programmpaket, einschließlich GAP (Devereux, J., et al., Nucleic Acids Research 12 (12):387 (1984); Genetics Computer Group University of Wisconsin, Madison, (WI)); BLASTP, BLASTN, und FASTA (Altschul, S. et al., J. Mol. Biol. 215:403-410 (1999)). Das BLASTX Programm kann vom National Centre for Biotechnology Information (NCBI) und aus weiteren Quellen bezogen werden (BLAST Handbuch, Altschul S., et al., NCB NLM NIH Bethesda MD 20894; Altschul, S., et al., Mol. Biol. 215:403-410 (1990)). Auch der bekannte Smith Waterman-Algorithmus kann zur Bestimmung des Prozentsatzes der Identität verwendet werden.

Bevorzugte Parameter für den Aminosäuresequenz-Vergleich umfassen die nachstehenden:

Algorithmus: Needleman und Wunsch, J. Mol. Biol 48:443-453 (1970)

Vergleichsmatrix:	BLOSUM 62 aus Henikoff und Henikoff, PNAS USA 89 (1992), 10915-10919
Lücken-Wert (Gap Penalty):	12
Lückenzahlen-Wert: (Gap Length Penalty):	4
Homologie-Schwellenwert: (Threshold of Similarity):	0

Das GAP-Programm ist auch zur Verwendung mit den vorstehenden Parametern geeignet. Die vorstehenden Parameter sind die Fehler-Parameter (default parameters) für Aminosäuresequenz-Vergleiche, wobei Lücken an den Enden den Wert nicht verändern. Die Erfindung umfasst daher auch Fusionsproteine, d.h. Protonen-translozierende Retinalproteine mit einem Fusionsproteinanteil. Bei sehr kurzen Sequenzen im Vergleich zur Referenz-Sequenz kann es weiterhin notwendig sein, den Erwartungswert auf bis zu 100.000 (expectation value) zu erhöhen und gegebenenfalls die Wortlänge (word size) auf bis zu 2 zu verkleinern.

Weitere beispielhafte Algorithmen, Lücken-Öffnungs-Werte (gap opening penalties), Lückenausdehnungs-Werte (gap extension penalties), Vergleichsmatrizen einschließlich der im Programm-Handbuch, Wisconsin-Paket, Version 9, September 1997, genannten können verwendet werden. Die Auswahl wird von dem durchzuführenden Vergleich abhängen und weiterhin davon, ob der Vergleich zwischen Sequenzpaaren, wobei GAP oder Best Fit bevorzugt sind, oder zwischen einer Sequenz und einer umfangreichen Sequenz-Datenbank, wobei FASTA oder BLAST bevorzugt sind, durchgeführt wird.

Eine mit dem oben genannten Algorithmus ermittelte Übereinstimmung von 40% wird im Rahmen dieser Anmeldung als 40% Identität bezeichnet. Entsprechendes gilt für höhere Prozentsätze.

Überraschenderweise hat sich nunmehr gezeigt, dass die Kombination einer Typ 1-Mutation und einer Typ 2-Mutation im erfindungsgemäßen Protonen-translozierenden Reti-

nalprotein zu einer weitgehenden Konstanz des all-*trans*-Retinal-Gehaltes sowie zu einer Verlangsamung des Photozyklus führen kann. Der all-*trans*-Retinal-Gehalt der Dunkel-adaptierten Form des erfindungsgemäßen Protonen-translozierenden Retinalproteins unterscheidet sich von dem der Hell-adaptierten Form in der Regel um nicht mehr als 10%. In bevorzugten Ausführungsformen sind die Unterschiede sogar geringer und liegen bei maximal 8 oder sogar maximal 5%. Überraschenderweise hat sich weiterhin gezeigt, dass gerade Muteine, deren all-*trans*-Retinal-Gehalt sich im Hell- und im Dunkel-adaptierten Zustand nicht wesentlich, d.h., um nicht mehr als 10% unterscheidet, einen all-*trans*-Retinal-Gehalt von mindestens 60% in Hell- wie im Dunkel-adaptierten Zustand aufweisen. Dieser unerwartete Nebeneffekt ist äußerst vorteilhaft, da jede Erhöhung des Anteils der Moleküle, die am „*trans*-Zyklus“ teilnehmen, bei Belichtung zu einem deutlicheren Farbwechsel und damit zu einer Verbesserung der optischen Eigenschaften führt.

Erfindungsgemäß werden Muteine bereitgestellt, die einen konstanten all-*trans*-Retinal-Gehalt im Bereich von mindestens 60 bis 100%, bevorzugt 62% oder 65% bis 100% aufweisen. Während die meisten Retinalproteine einen all-*trans*-Retinal-Gehalt im Bereich von 60 oder 65% bis 85% aufweisen, sehen besonders bevorzugte Ausführungsformen einen all-*trans*-Retinal-Gehalt von mindestens 70% oder 75%, am besten sogar 80% bis 100% vor.

In einer bevorzugten Ausführungsform ist das natürliche Protonen-translozierende Retinalprotein, dessen Mutein(e) die oben erwähnten Eigenschaften aufweisen, ein archaebakterielles Bakteriorhodopsin, z.B. ein halobakterielles Rhodopsin, bevorzugt Bakteriorhodopsin (SEQ ID No.1) aus *Halobacterium salinarum*.

Das erfindungsgemäße Protonen-translozierende Retinalprotein umfasst Muteine mit einer Typ 1- und einer Typ 2-Mutation, deren Aminosäuresequenz mit der Aminosäuresequenz SEQ ID No.1 eine Identität von mindestens 40% aufweist. In weiteren Ausführungsformen beträgt die Identität mindestens 50, 60 oder 70%. In besonders bevorzugten Ausführungsformen beträgt die Identität mindestens 80, 90 oder 95%.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform handelt es sich bei dem Protonen-translozierenden Retinalprotein um ein Homolog mit einer Aminosäuresequenz, das im Bereich der C-Helix und/oder der F-Helix eine Identität von mindestens 60% mit den entsprechenden Aminosäuresequenzen des reifen Bakteriorhodopsins aus SEQ ID No.1 aufweist. In weiter bevorzugten Ausführungsformen liegt der Prozentsatz der Identität für die C-Helix und/oder die F-Helix bei mindestens 70, 80 oder 90%, bevorzugt bei mindestens 95%. Der Identitätsgrad für die C- und die F-Helix kann dabei gleich oder verschieden sein.

Der Photozyklus des erfindungsgemäßen Protonen-translozierenden Retinalproteins wird durch die Typ 1-Mutation verlangsamt. Die thermische Zykluszeit beträgt in jedem Fall mehr als 10 ms, bevorzugt mehr als 1 s oder gar mehr als 10 s. In besonders bevorzugten Ausführungsformen liegt die thermische Zykluszeit im Minutenbereich, d.h. sie beträgt mehr als 1 min, in weiteren bevorzugten Ausführungsformen sogar mehr als 5 oder 10 min. Die thermische Zykluszeit kann im Extremfall bis zu 2 Stunden betragen, in der Regel jedoch nicht mehr als 90 oder 60 min.

Die Typ 1-Mutation des Protonen-translozierenden Retinalproteins kann in einem Aminosäureaustausch an einer oder mehreren der Aminosäurepositionen bestehen, die im natürlichen Protein am katalytischen Zyklus beteiligt sind. Die vorliegende Erfindung umfaßt daher Retinalproteine, bei denen z.B. eine oder mehrere der Positionen der an der Protonen-Translokation beteiligten Aminosäuren aus der Gruppe der Aminosäurereste D38, R82, D85, D96, D102, D104, E194 und/oder E204 gemäß SEQ ID No.1 bzw. der ihnen entsprechenden Aminosäurereste in homologen Proteinen verändert ist. Ein bevorzugter Aminosäureaustausch ist D96N, d.h. die Aminosäure D an Position 96 von SEQ ID No.1 bzw. die entsprechende Aminosäure in einem homologen Protein wird durch N ersetzt. Weiter bevorzugte Aminosäureaustausche sind D38R und D102R und/oder D104R.

Die Typ 2-Mutation der Retinalproteine der erfindungsgemäßen Retinalproteine führt zu einem Aminosäureaustausch an einer oder mehrerer der Aminosäurepositionen, die die Retinalbindungstasche bilden, und/oder unmittelbar benachbarter Positionen. Unter der Retinalbindungstasche wird die Summe der Aminosäuren verstanden, die der Schiff'schen Ba-

se des Retinals ihre charakteristischen chemischen und physikalischen Eigenschaften verleihen. Die die Retinalbindungstasche bildenden Aminosäuren bzw. unmittelbar benachbarte Aminosäuren sind ausgewählt aus der Gruppe der Aminosäurereste Val49, Ala53, L93, Met118, Gly122, S141 und Met145 gemäß SEQ ID No.1 bzw. der ihnen entsprechenden Aminosäurereste in homologen Proteinen. In bevorzugten Ausführungsformen ist die Typ 2-Mutation V49A, V49G, V49F, L93A, G122K, G122C, G122M, S141A, S141M, M145I, M145F, M145W, M145C oder M145K. Diese Typ 2-Mutationen bewirken überraschenderweise eine Konstanz des all-*trans* Anteils im Retinylidenteil des Bakteriorhodopsins im Hell- und im Dunkel-adaptierten Zustand.

Absorptionsmaxima und Retinalisomerenverhältnisse des *Halobacterium salinarum* Wildtyps (WT), der reinen Typ 1-Mutante D96N, der reinen Typ 2-Mutanten M145F und L93A sowie der erfindungsgemäßen Retinalproteine D96N-M145F und D96N-L93A sind in der nachfolgenden Tabelle gezeigt:

Stamm	λ_{\max} in nm		Isomere			
	DA	HA	DA		HA	
			all- <i>trans</i>	13- <i>cis</i>	all- <i>trans</i>	13- <i>cis</i>
WT	560	568	60	40	98	2
D96N	560	569	54	46	96	4
M145F	558	559	72	28	86	14
D96N-M145F	560	560	66	34	67	33
L93A	541	541	80	20	82	18
D96N-L93A	544	544	80	20	81	19

Anm.: „DA“ bedeutet „Dunkel-adaptiert“

„HA“ bedeutet „Hell-adaptiert“

Besonders bevorzugte Kombinationen von Typ 1- und Typ 2-Mutationen sind beispielsweise V49A-D96N, L93A-D96N und M145F-D96N (s. Figur 1).

In einer weiteren Ausführungsform liegen die erfindungsgemäßen Retinalproteine in membrangebundener Form vor, wobei die Membran eine Dichte zwischen 1,10 und 1,20 g/cm³ aufweist. In einer bevorzugten Ausführungsform beträgt die Dichte zwischen 1,175 und 1,185 g/cm³. Besonders bevorzugt ist die Form einer Purpurmembran mit einer Dichte von 1,18 g/cm³.

Erfindungsgemäß werden weiterhin Nukleinsäuren bereitgestellt, die für die oben beschriebenen Retinalproteine kodieren. Diese Nukleinsäuren können einmal durch Mutationen bereits bekannter Gene für Protonen-translozierende Retinalproteine, z.B. des für das Bakteriorhodopsin aus *Halobacterium salinarum* kodierenden Genes erzeugt werden (Dunn et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 6744-6748, 1981), zum anderen nach bekannten Verfahren vollsynthetisch hergestellt werden. Da der genetische Code der Archaea sich von dem der Prokarya und Eukarya nicht unterscheidet, können auch zur Transformation in Halobakterien vorgesehene Nukleinsäuren nach den bekannten Regeln hergestellt werden. Der Fachmann wird sich allerdings bemühen, eine auf den jeweils vorgesehenen Wirtsorganismus abgestimmte Codon-Usage zu berücksichtigen. Bei den erfindungsgemäßen Nukleinsäuren kann es sich um Ribonukleinsäuren und/oder Desoxyribonukleinsäuren handeln.

Erfindungsgemäß werden weiterhin Vektoren zur Verfügung gestellt, die die für die Protonen-translozierenden Retinalproteine kodierenden Nukleinsäuren umfassen. Je nach dem für diesen Vektor vorgesehenen Wirtsorganismus wird der Fachmann zwischen archaeobakteriellen Vektoren, Vektoren für die Expression in Prokarya (*E. coli*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Klebsiella* etc.) oder Eukarya (Hefe, Tierzellkulturen (CHO, HeLa, COS etc.), Pflanzen oder Pflanzenzellen, Insektenzellen) auswählen.

Erfindungsgemäß wird weiterhin eine Wirtszelle bereitgestellt, die eine für ein erfindungsgemäßes Protonen-translozierendes Retinalprotein kodierende Nukleinsäure oder einen erfindungsgemäßen Vektor enthält. Bei den Wirtszellen handelt es sich z.B. um Archaea, bevorzugt Halobakterien, besonders bevorzugt *Halobacterium salinarum*, dessen Transformation beschrieben ist (Cline et al., Can. J. Microbiol. 35, 148-152, 1989). Alternativ

können erfindungsgemäße Vektoren auch in *E. coli* oder anderen prokaryontischen Wirten, bei Bedarf auch in den oben erwähnten eukaryontischen Zellen exprimiert werden.

Erfindungsgemäß wird weiterhin eine photochrome Zusammensetzung bereitgestellt, die zusätzlich zu einem erfindungsgemäßen Protonen-translozierenden Retinalprotein Stabilisatoren, die Schaumbildung vermindern und/oder UV-Licht absorbierende Zusatzstoffe und/oder Puffersubstanzen enthalten kann.

Die erfindungsgemäße photochrome Zusammensetzung kann z.B. Glycerin, organische Polymere und/oder organische Lösungsmittel enthalten.

Die erfindungsgemäßen Protonen-translozierenden Retinalproteine oder die sie enthaltenden photochromen Zusammensetzungen können zum Herstellen von optischen Filmen verwendet werden. Die Herstellung optischer Filme aus Bakteriorhodopsinen ist bereits bekannt und z.B. in Hampp et al., SPIE 3623, 243, 1999 ausführlich beschrieben. Ein unter Verwendung der erfindungsgemäßen Protonen-translozierenden Retinalproteine hergestellter optischer Film ist für optische Aufzeichnungen geeignet. Eine weitere Verwendungsmöglichkeit solcher optischen Filme ist mit der Interferometrie oder bei der holographischen Mustererkennung gegeben. Auch die Verwendung optischer Filme als optischer Lichtmodulator ist möglich. Darüberhinaus ist die Herstellung volumenhafter Speicher zur optischen Datenspeicherung denkbar (Birge, Scientific American, 1995, 66).

Die vorliegende Erfindung stellt des Weiteren die Verwendung eines Protonen-translozierenden Retinalproteins und/oder einer photochrome Zusammensetzung als Sicherheitsfarbstoff bereit. In einer ersten Ausführungsform wird das Retinalprotein und/oder die photochrome Zusammensetzung auf ein sicherungsbedürftiges Dokument oder einen sicherungsbedürftigen Gegenstand aufgetragen. In einer weiteren Ausführungsform kann die auf das sicherungsbedürftige Dokument oder den sicherungsbedürftigen Gegenstand aufgetragene erfindungsgemäße photochrome Zusammensetzung (bzw. das Retinalprotein) auf dem Dokument oder Gegenstand fixiert werden.

Dabei kann die Fixierung gemäß der vorliegenden Erfindung durch physikalischen Einschluß oder kovalente Kopplung an das Dokument bewirkt werden. Erfindungsgemäß ist das sicherungsbedürftige Dokument beispielsweise ein Sicherheitspapier, ein Ausweis oder eine Banknote. Als Dokument kann jedoch erfindungsgemäß auch jedes weitere Dokument gelten, für das ein Sicherungsbedarf besteht.

Schließlich stellt die vorliegende Erfindung ein Verfahren zum Herstellen von Dokumenten mit Sicherheitsmerkmal bereit, das dadurch gekennzeichnet ist, dass vor, während oder nach der Herstellung eines Dokumentes in üblicher Weise ein erfindungsgemäßes Protonen-translozierendes Retinalprotein oder eine erfindungsgemäße photochrome Zusammensetzung aufgetragen und gegebenenfalls fixiert wird.

Die folgenden Figuren und Beispiele erläutern die Erfindung.

Figur 1 zeigt die Absorptionsspektren verschiedener erfindungsgemäßer Protonen-translozierender Retinalproteine im Vergleich zu dem Spektrum des Wildtyps bzw. von Muteinen mit nur einer Mutation. Die durchgezogenen Linien zeigen jeweils das Absorptionsspektrum im Hell-adaptierten Zustand, die gepunkteten Linien im Dunkel-adaptierten Zustand. Im Einzelnen zeigen:

- Figur 1A Wildtyp *Halobacterium salinarum* mit der Aminosäuresequenz von SEQ ID No.1. Das Absorptionsmaximum im Hell-adaptierten Zustand liegt bei 568 nm, im Dunkel-adaptierten Zustand bei 560 nm.
- Figur 1B Absorptionsspektrum der Typ 1-Mutante D96N. Das Absorptionsmaximum verschiebt sich von 569 nm im Hell-adaptierten Zustand nach 560 nm im Dunkel-adaptierten Zustand.
- Figur 1C Typ 2-Mutante V49A. Das Absorptionsmaximum liegt im Hell-adaptierten wie im Dunkel-adaptierten Zustand bei 549 nm.
- Figur 1D Erfindungsgemäßes Retinalprotein mit der Doppelmutation V49A-D96N. Das Absorptionsmaximum von 559 nm im Hell-adaptierten Zustand wird um 2 nm nach 557 nm im Dunkel-adaptierten Zustand verschoben.

- Figur 1E Typ 1-Mutation L93A. Das Absorptionsmaximum liegt im Hell-adaptierten wie im Dunkel-adaptierten Zustand bei 541 nm.
- Figur 1F Erfindungsgemäßes Retinalprotein mit der Doppelmutation L93A-D96N. Das Absorptionsmaximum liegt im Hell-adaptierten wie im Dunkel-adaptierten Zustand bei 544 nm. Diese Doppelmutante erreicht im Dunkel-adaptierten Zustand einen all-*trans* Anteil von mehr als 80%.
- Figur 1G Typ 2-Mutation M145F. Das Absorptionsmaximum liegt im Hell-adaptierten Zustand bei 559 nm, im Dunkel-adaptierten Zustand bei 558 nm.
- Figur 1H Erfindungsgemäßes Retinalprotein mit der Doppelmutation D96N-M145F. Diese Doppelmutante erreicht im Dunkel-adaptierten Zustand einen all-*trans* Anteil von 66%; das Absorptionsmaximum liegt für das Hell-adaptierte wie für das Dunkel-adaptierte Retinalprotein bei 560 nm.

Beispiel 1

Herstellung einer photochromen Zusammensetzung

Für die Herstellung einer photochromen Zusammensetzung werden zunächst die einzelnen Protonen-translozierenden Retinalproteine entweder aus natürlichen Halobakterienpopulationen oder rekombinant durch Transformation von *Halobacterium salinarum* (Cline & Doolittle, J. Bact. 169, 1341-1344, 1987) nach stellenspezifischer Mutagenese des Bakteriorhodopsingenes (Dunn et al., Proc. Natl. Acad. Sc., USA 78, 6744-6748) gewonnen. Die Purpormembran der transformierten Halobakterien wird mittels bekannter Verfahren isoliert und gereinigt (Oesterhelt & Stoeckenius, Meth. Enzym. 31, 667-678, 1974). Für die Gewinnung von Bakteriorhodopsin in großem Maßstab kann das in der deutschen Patentanmeldung 199 45 798.0 beschriebene Verfahren eingesetzt werden.

Beispiel 2

Fixierung der photochromen Zusammensetzung auf einer Oberfläche

Die erfindungsgemäße photochrome Zusammensetzung kann beispielsweise physikalisch in ein Matrixmaterial eingeschlossen werden. Konkret werden z.B. 10 mg Purpurmembra, enthaltend Bakteriorhodopsin-D96N/M145F in 4 ml einer UV-härtenden Farbe (IFS 3000, Firma Schmitt) gleichmäßig suspendiert und auf das sicherungsbedürftige Dokument aufgetragen. Nach UV-Belichtung (nach Angaben des Herstellers) des solcherart markierten Dokumentes befinden sich die Purpurmembraartikel im ausgehärteten Kunststoff.

Beispiel 3

Applikation der photochromen Zusammensetzung mittels verschiedener VerfahrenSiebdruck

Das Prinzip des Siebdrucks ist Durchdruck, ähnlich einer Schabloniertechnik. Die Druckform besteht aus einem Siebgewebe, welches mit einer farbundurchlässigen Sperrschicht versehen wird. Das Druckmotiv bleibt offen. Der Druck erfolgt durch das Abziehen des mit Farbe gefüllten Siebes mit einer Rakel. Die Farbe wird dabei auf das darunterliegende Substrat übertragen. Zur Herstellung einer Siebdruckfarbe wird in eine 7,2% PVA-Lösung (Mowiol Typ 56-98) 100 mg/ml Purpurmembra über Nacht eingerührt. Bei Übereinstimmung der rheologischen Eigenschaften mit einer Standardprobe kann die erhaltene Mischung mit einer herkömmlichen Siebdruckmaschine verdruckt werden.

Offsetdruck

In 5 ml einer Farbe ohne Pigment (Fa. Schmitt, UFO1) werden bei 50 °C 1 g Purpurmembra eingerührt. Die so erhaltene Mischung kann mittels gängiger Offset-Technik verdruckt werden.

Beispiel 4Herstellen eines abriebbeständigen Sicherheitsmerkmals

Eine Abriebbeständigkeit der photochromen Zusammensetzung kann erzielt werden, in dem z.B. die mit Protonen-translozierendem Retinalprotein beschichteten Dokumente mittels eines Heißlaminiergerätes (GPM, Mylam 9) in einer Folientasche vom Typ GHQ-120TR bei einer Temperatur von 90 bis 140 °C einlaminiert werden.

Beispiel 5Erhöhung der UV-Beständigkeit des Sicherheitsmerkmals

Um die UV-Beständigkeit des erfindungsgemäßen Sicherheitsmerkmals zu erhöhen, wird die photochrome Zusammensetzung mit einem UV-Absorber oder einem Derivat davon in einer Konzentration von 1 bis 30%, bevorzugt 3 bis 10% w/w versetzt. Bevorzugte UV-Absorber sind Benzophenon, Hydroxynaphthochinon, Phenylbenzoxazol, Zimtsäureester, Sulfonamid und Aminobenzoessäureester.

Ansprüche

1. Protonen-translozierendes Retinalprotein, ausgewählt aus der Gruppe von:
 - (i) Muteinen eines natürlichen Protonen-translozierenden Retinalproteins aus halophilen Archaeobakterien, die einen verlangsamten Photozyklus aufweisen (Typ 1-Mutation) und deren all-*trans*-Retinal-Gehalt im Hell- und im Dunkel-adaptierten Zustand um nicht mehr als 10% voneinander abweicht (Typ 2-Mutation) und/oder
 - (ii) Homologen der Muteine (i) mit verlangsamten Photozyklus, deren all-*trans*-Retinal-Gehalt im Hell- und im Dunkel-adaptierten Zustand um nicht mehr als 10% voneinander abweicht.
2. Protonen-translozierendes Retinalprotein nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass seine Retinalisomeren-Zusammensetzung im Hell- und im Dunkel-adaptierten Zustand mindestens 60% all-*trans*-Retinal aufweist.
3. Protonen-translozierendes Retinalprotein nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass das natürliche Protonen-translozierende Retinalprotein ein archaeobakterielles Rhodopsin ist.
4. Protonen-translozierendes Retinalprotein nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass das archaeobakterielle Rhodopsin ein Rhodopsin aus Halobakterien ist.
5. Protonen-translozierendes Retinalprotein nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass das archaeobakterielle Rhodopsin Bakteriorhodopsin (SEQ ID No.1) aus *Halobacterium salinarum* ist.

6. Protonen-translozierendes Retinalprotein nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass das Homolog eine Aminosäuresequenz aufweist, die mit der Aminosäuresequenz SEQ ID No.1 mindestens 40% Identität aufweist.
7. Protonen-translozierendes Retinalprotein nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass das Homolog eine Aminosäuresequenz aufweist, die im Bereich der C- und/oder F-Helix mindestens 60% Identität mit der Aminosäuresequenz SEQ ID No.1 aufweist.
8. Protonen-translozierendes Retinalprotein nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass der Photozyklus der Muteine mit einer Typ 1-Mutation eine thermische Zykluszeit von mehr als 10 ms aufweist.
9. Protonen-translozierendes Retinalprotein nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass die Typ 1-Mutation ein Aminosäureaustausch an einer oder mehreren der Aminosäurepositionen ist, die im natürlichen Protein am katalytischen Zyklus beteiligt sind.
10. Protonen-translozierendes Retinalprotein nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, dass die am katalytischen Zyklus beteiligten Aminosäuren aus der die Aminosäurereste D38, R82, D85, D96, D102, D104, E194 und/oder E204 umfassenden Gruppe ausgewählt sind.
11. Protonen-translozierendes Retinalprotein nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, dass die Typ 2-Mutation ein Aminosäureaustausch an einer oder mehrerer der Aminosäurepositionen ist, die die Retinalbindungstasche bilden.
12. Protonen-translozierendes Retinalprotein nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, dass die die Retinalbindungstaschen bildenden Aminosäuren aus der die Aminosäurereste Val49, Ala53, L93, Met118, Gly122, S141 und Met145 umfassenden Gruppe ausgewählt sind.

13. Protonen-translozierendes Retinalprotein nach einem der Ansprüche 1 bis 12, dadurch gekennzeichnet, dass es ein Mutein des Bakteriorhodopsins aus *Halobacterium salinarum* (SEQ ID No.1) mit aus der folgenden Gruppe ausgewählten Mutationen:
V49A-D96N; L93A-D96N; M145F-D96N
oder ein Homolog eines solchen Muteins ist.
14. Protonen-translozierendes Retinalprotein nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 13, dadurch gekennzeichnet, dass das Retinalprotein in Form einer Purpurmembran vorliegt.
15. Protonen-translozierendes Retinalprotein nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, dass die Dichte der Purpurmembran zwischen 1,10 und 1,20 g/cm³ beträgt.
16. Protonen-translozierendes Retinalprotein nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, dass die Dichte der Purpurmembran 1,175 bis 1,185 g/cm³ beträgt.
17. Nukleinsäure, kodierend für ein Protonen-translozierendes Retinalprotein nach einem der Ansprüche 1 bis 13.
18. Vektor, umfassend eine Nukleinsäure gemäß Anspruch 17.
19. Wirtszelle, enthaltend eine Nukleinsäure gemäß Anspruch 17 und/oder einen Vektor gemäß Anspruch 18.
20. Photochrome Zusammensetzung, enthaltend mindestens ein Protonen-translozierendes Retinalprotein nach einem der Ansprüche 1 bis 16, weiter enthaltend ein oder mehrere Zusatzstoffe, ausgewählt aus Stabilisatoren, die Schaumbildung verringern, Zusatzstoffen, UV-Licht absorbierenden Zusatzstoffen und Puffersubstanzen.

21. Photochrome Zusammensetzung nach Anspruch 20, dadurch gekennzeichnet, dass Glycerin, organische Polymere und/oder organische Lösungsmittel enthalten sind.
22. Verwendung eines Protonen-translozierenden Retinalproteins nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 16 und/oder einer photochromen Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 20 oder 21 zum Herstellen von optischen Filmen.
23. Verwendung nach Anspruch 22, dadurch gekennzeichnet, dass der optische Film für die optische Aufzeichnung geeignet ist.
24. Verwendung nach Anspruch 22, dadurch gekennzeichnet, dass der optische Film für die Interferometrie geeignet ist.
25. Verwendung nach Anspruch 22, dadurch gekennzeichnet, dass der optische Film für die holographische Mustererkennung geeignet ist.
26. Verwendung nach Anspruch 22, dadurch gekennzeichnet, dass der optische Film als optischer Lichtmodulator geeignet ist.
27. Verwendung eines Protonen-translozierenden Retinalproteins gemäß einem der Ansprüche 1 bis 16 zum Herstellen volumenhafter Speicher zur optischen Datenspeicherung.
28. Verwendung eines Protonen-translozierenden Retinalproteins nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 16 oder einer photochromen Zusammensetzung nach mindestens einem der Ansprüche 20 oder 21 als Sicherheitsfarbstoff.
29. Verwendung nach Anspruch 28, dadurch gekennzeichnet, dass das Protonen-translozierende Retinalprotein und/oder die photochrome Zusammensetzung auf ein sicherungsbedürftiges Dokument oder einen sicherungsbedürftigen Gegenstand aufgetragen wird.

30. Verwendung nach Anspruch 29, dadurch gekennzeichnet, dass das auf das sicherungsbedürftige Dokument oder den Gegenstand aufgetragene Protonen-translozierende Retinalprotein und/oder die photochrome Zusammensetzung auf dem Dokument oder den Gegenstand fixiert wird.
31. Verwendung nach Anspruch 30, dadurch gekennzeichnet, dass die Fixierung durch physikalischen Einschluß oder kovalente Kopplung an das Dokument oder den Gegenstand bewirkt ist.
32. Verwendung nach einem der Ansprüche 29 bis 31, dadurch gekennzeichnet, dass das sicherungsbedürftige Dokument ein Sicherheitspapier ist.
33. Verwendung nach einem der Ansprüche 29 bis 31, dadurch gekennzeichnet, dass das sicherungsbedürftige Dokument ein Ausweis ist.
34. Verwendung nach einem der Ansprüche 29 bis 31, dadurch gekennzeichnet, dass das sicherungsbedürftige Dokument eine Banknote ist.
35. Verfahren zum Herstellen von Dokumenten mit Sicherheitsmerkmal, dadurch gekennzeichnet, dass vor, während oder nach der Herstellung eines Dokumentes in üblicher Weise ein Protonen-translozierendes Retinalprotein gemäß einem der Ansprüche 1 bis 16 oder eine photochrome Zusammensetzung gemäß einem der Ansprüche 17 oder 18 aufgetragen und gegebenenfalls fixiert wird.

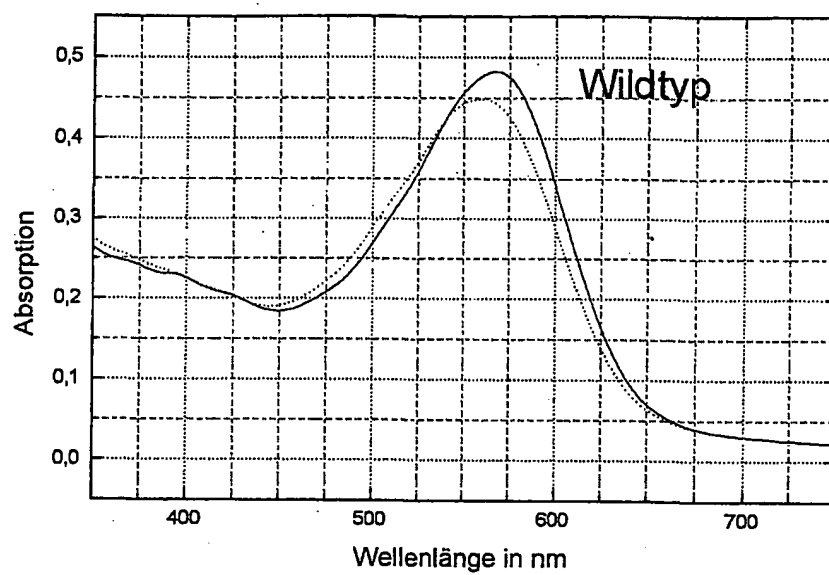


Fig. 1A

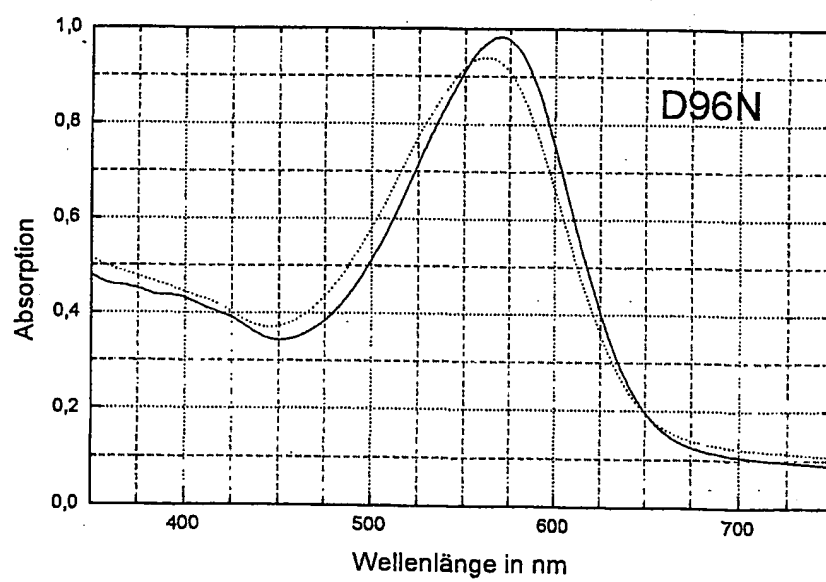


Fig. 1B

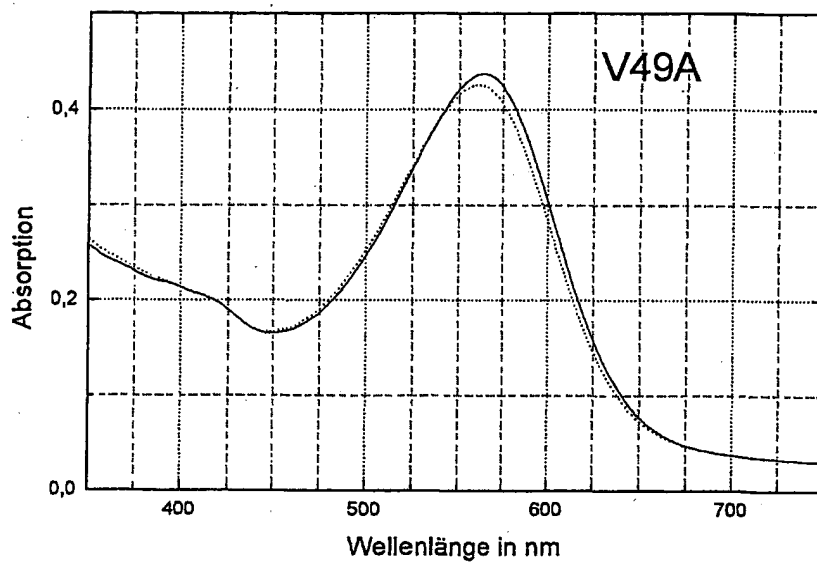


Fig. 1C

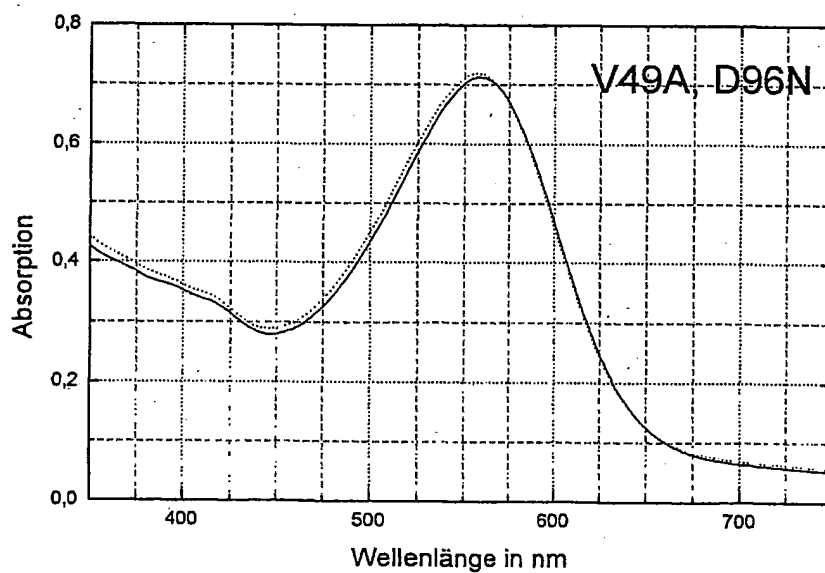


Fig. 1D

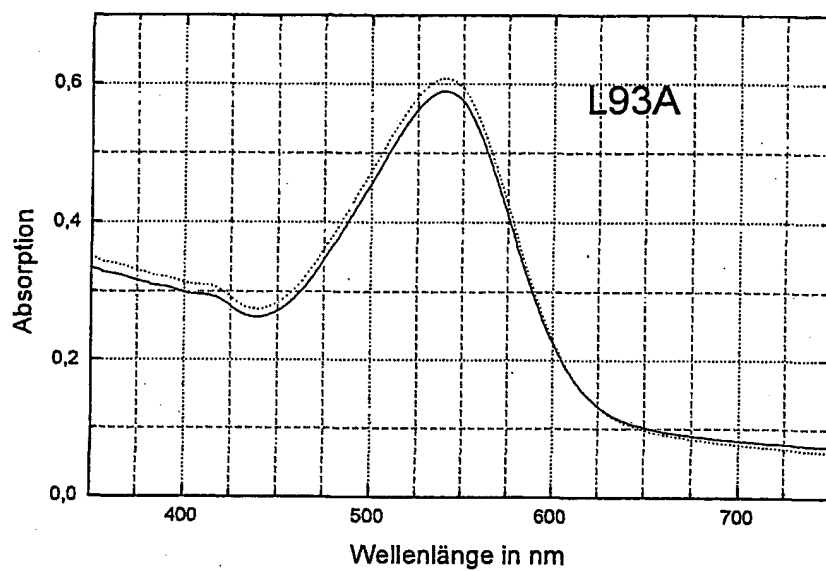


Fig. 1E

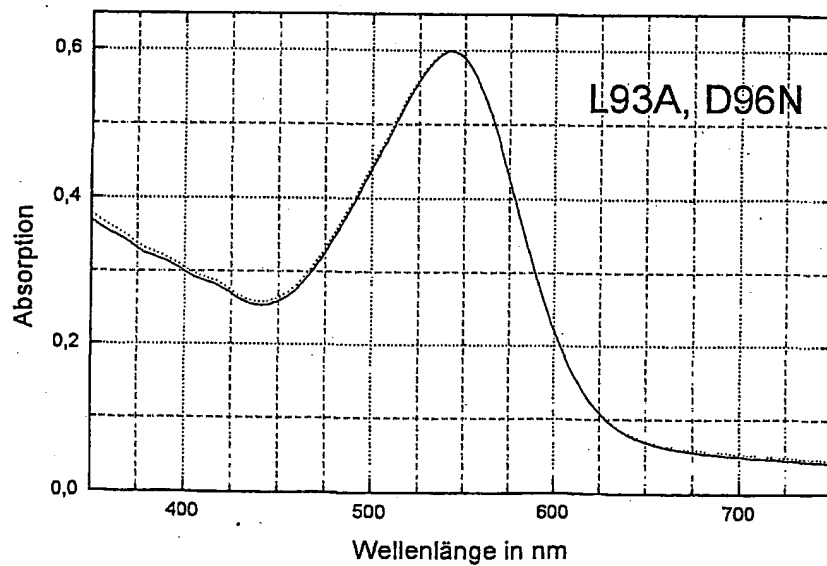


Fig. 1F

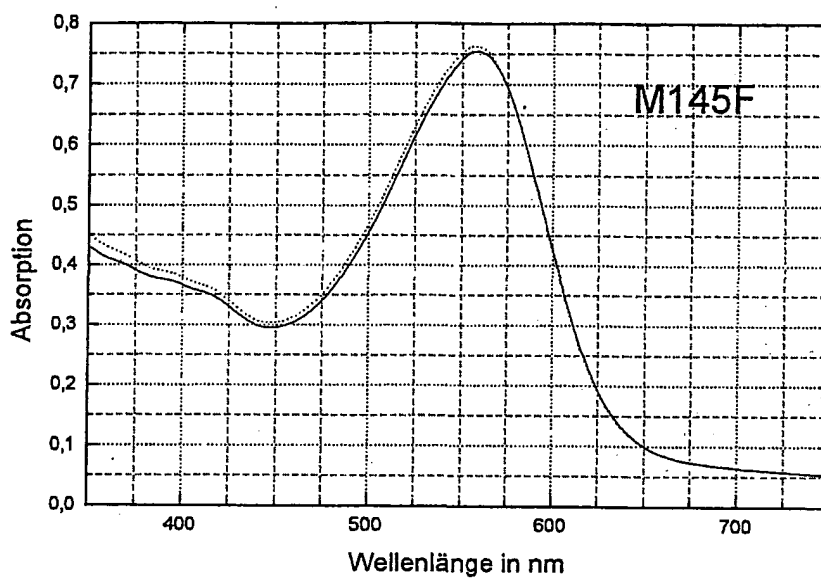


Fig 1G

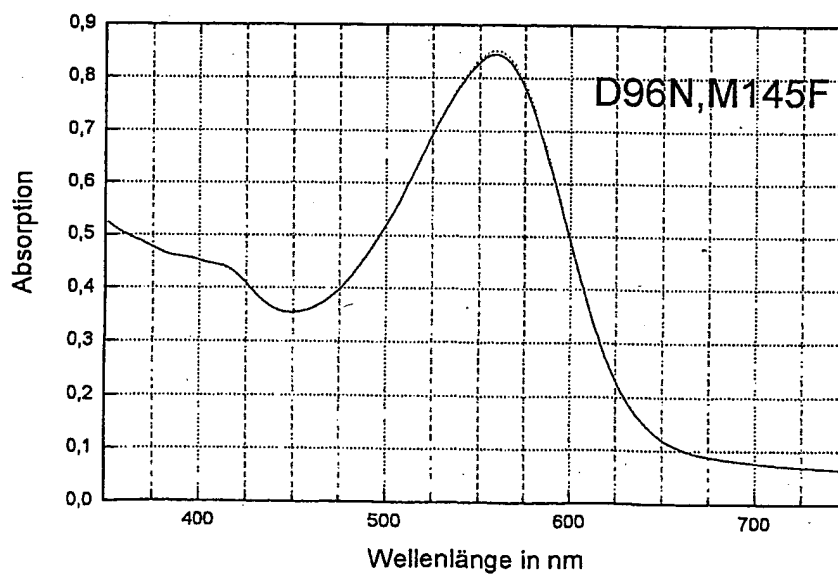


Fig 1H

SEQUENZPROTOKOLL

<110> Max-Planck-Gesellschaft

<120> Photochrome Zusammensetzung

<130> p31928

<140>

<141>

<150> 1

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 248

<212> PRT

<213> Halobacterium salinarum

<400> 1

Glu Ala Gln Ile Thr Gly Arg Pro Glu Trp Ile Trp Leu Ala Leu Gly
 1 5 10 15

Thr Ala Leu Met Gly Leu Gly Thr Leu Tyr Phe Leu Val Lys Gly Met
 20 25 30

Gly Val Ser Asp Pro Asp Ala Lys Lys Phe Tyr Ala Ile Thr Thr Leu
 35 40 45

Val Pro Ala Ile Ala Phe Thr Met Tyr Leu Ser Met Leu Leu Gly Tyr
 50 55 60

Gly Leu Thr Met Val Pro Phe Gly Gly Glu Gln Asn Pro Ile Tyr Trp
 65 70 75 80

Ala Arg Tyr Ala Asp Trp Leu Phe Thr Thr Pro Leu Leu Leu Asp
 85 90 95

Leu Ala Leu Leu Val Asp Ala Asp Gln Gly Thr Ile Leu Ala Leu Val
 100 105 110

Gly Ala Asp Gly Ile Met Ile Gly Thr Gly Leu Val Gly Ala Leu Thr
 115 120 125

Lys Val Tyr Ser Tyr Arg Phe Val Trp Trp Ala Ile Ser Thr Ala Ala
 130 135 140

Met Leu Tyr Ile Leu Tyr Val Leu Phe Phe Gly Phe Thr Ser Lys Ala
145 150 155 160

Glu Ser Met Arg Pro Glu Val Ala Ser Thr Phe Lys Val Leu Arg Asn
165 170 175

Val Thr Val Val Leu Trp Ser Ala Tyr Pro Val Val Trp Leu Ile Gly
180 185 190

Ser Glu Gly Ala Gly Ile Val Pro Leu Asn Ile Glu Thr Leu Leu Phe
195 200 205

Met Val Leu Asp Val Ser Ala Lys Val Gly Phe Gly Leu Ile Leu Leu
210 215 220

Arg Ser Arg Ala Ile Phe Gly Glu Ala Glu Ala Pro Glu Pro Ser Ala
225 230 235 240

Gly Asp Gly Ala Ala Ala Thr Ser
245

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
7. Februar 2002 (07.02.2002)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 02/10207 A3

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: C07K 14/215,
C12N 15/31, G03C 1/73, G11B 7/24

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP01/08715

(22) Internationales Anmeldedatum:
27. Juli 2001 (27.07.2001)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
100 36 745.3 27. Juli 2000 (27.07.2000) DE
100 48 383.6 29. September 2000 (29.09.2000) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme
von US): MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT ZUR
FÖRDERUNG DER WISSENSCHAFTEN E.V.
[DE/DE]; Generalverwaltung, Hofgartenstrasse 8, 80539
München (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): OESTERHELT,
Dieter [DE/DE]; Werdenfelsstrasse 17, 81377 München
(DE). HAMPP, Norbert [DE/DE]; Schillerstrasse 19,
35287 Amöneburg-Rossdorf (DE). PFEIFER, Matthias
[DE/DE]; Deutschhausstrasse 46, 35037 Marburg (DE).

(74) Anwalt: GRÜNECKER, KINKELDEY, STOCKMAIR
& SCHWANHÄUSSER; Maximilianstrasse 58, 80538
München (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT,
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR,
CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE,
GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ,
LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN,
MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI,
SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU,
ZA, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW),
eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,
TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK,
ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR),
OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW,
ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

- mit internationalem Recherchenbericht
- vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden
Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen
eintreffen

(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen
Recherchenberichts: 18. April 2002

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen
Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on
Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe
der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: PROTON-TRANSLOCATING RETINAL PROTEIN

(54) Bezeichnung: PROTONEN-TRANSLOZIERENDES RETINALPROTEIN

(57) Abstract: The invention relates to proton-translocating retinal proteins, which have a slower photocycle in comparison to the wild type and whose all *trans* retinal content in both the light-adapted and dark-adapted states does not differ by more than 10 %. The invention also relates to a photochromic composition and to the use of both the proton-translocating retinal proteins and the photochromic composition.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft Protonen-translozierende Retinalproteine, die einen gegenüber dem Wildtyp verlangsamt Photozyklus aufweisen und deren all-*trans*-Retinal-Gehalt im Hell und im Dunkel-adaptierten Zustand um nicht mehr als 10% voneinander abweicht. Die Erfindung betrifft weiterhin eine photochrome Zusammensetzung und die Verwendung der Protonen-translozierenden Retinalproteine sowie der photochromen Zusammensetzung.



WO 02/10207 A3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. l. Application No

PCT/EP 01/08715

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C07K14/215 C12N15/31 G03C1/73 G11B7/24

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C07K G03C

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, PAJ, MEDLINE, SEQUENCE SEARCH

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>DELANEY JOHN K ET AL: "The residues Leu 93 and Asp 96 act independently in the bacteriorhodopsin photocycle: Studies with the Leu 93 ->Ala, Asp 96 -> Asn double mutant."</p> <p>BIOPHYSICAL JOURNAL, vol. 70, no. 5, 1996, pages 2366-2372, XP001026895 ISSN: 0006-3495 abstract page 2367, left-hand column, paragraph 5 page 2368, left-hand column -page 2369, left-hand column, paragraph 1</p> <p>---</p> <p>-/--</p>	1-19

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *G* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

29 January 2002

Date of mailing of the international search report

08/02/2002

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Niebuhr-Ebel, K

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int .tional Application No

PCT/EP 01/08715

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	OESTERHELT D ET AL: "BACTERIORHODOPSIN A BIOLOGICAL MATERIAL FOR INFORMATION PROCESSING" QUARTERLY REVIEWS OF BIOPHYSICS, vol. 24, no. 4, 1991, pages 425-478, XP002119796 ISSN: 0033-5835 the whole document -----	20-35
A	WO 94 05008 A (CONSORTIUM ELEKTROCHEM IND ;HAMPP NORBERT (DE); POPP ANDREAS (DE);) 3 March 1994 (1994-03-03) "Compositions of bacteriorhodopsin with increased memory time and their use" the whole document -----	20-35

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 01/08715

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9405008 A	03-03-1994	DE 4226868 A1	17-02-1994
		DE 59309190 D1	14-01-1999
		WO 9405008 A1	03-03-1994
		EP 0655162 A1	31-05-1995
		JP 2674634 B2	12-11-1997
		JP 7506690 T	20-07-1995
		US 6274279 B1	14-08-2001

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 01/08715

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES IPK 7 C07K14/215 C12N15/31 G03C1/73 G11B7/24		
Nach der internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK		
B. RECHERCHIERTE GEBIETE Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole) IPK 7 C07K G03C		
Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen		
Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe) EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, PAJ, MEDLINE, SEQUENCE SEARCH		
C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	DELANEY JOHN K ET AL: "The residues Leu 93 and Asp 96 act independently in the bacteriorhodopsin photocycle: Studies with the Leu 93 ->Ala, Asp 96 -> Asn double mutant." BIOPHYSICAL JOURNAL, Bd. 70, Nr. 5, 1996, Seiten 2366-2372, XP001026895 ISSN: 0006-3495 Zusammenfassung Seite 2367, linke Spalte, Absatz 5 Seite 2368, linke Spalte -Seite 2369, linke Spalte, Absatz 1 --- -/--	1-19
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div> <input checked="" type="checkbox"/> Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen </div> <div> <input checked="" type="checkbox"/> Siehe Anhang Patentfamilie </div> </div>		
<div style="display: flex;"> <div style="flex: 1;"> <p>* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :</p> <p>*A* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist</p> <p>*E* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist</p> <p>*L* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)</p> <p>*O* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht</p> <p>*P* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist</p> </div> <div style="flex: 1;"> <p>*T* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist</p> <p>*X* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden</p> <p>*Y* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist</p> <p>*Z* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist</p> </div> </div>		
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche 29. Januar 2002		Absendedatum des internationalen Recherchenberichts 08/02/2002
Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Bevollmächtigter Bediensteter Niebuhr-Ebel, K

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP 01/08715

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	OESTERHELT D ET AL: "BACTERIORHODOPSIN A BIOLOGICAL MATERIAL FOR INFORMATION PROCESSING" QUARTERLY REVIEWS OF BIOPHYSICS, Bd. 24, Nr. 4, 1991, Seiten 425-478, XP002119796 ISSN: 0033-5835 das ganze Dokument ---	20-35
A	WO 94 05008 A (CONSORTIUM ELEKTROCHEM IND ;HAMPP NORBERT (DE); POPP ANDREAS (DE);) 3. März 1994 (1994-03-03) "Compositions of bacteriorhodopsin with increased memory time and their use" das ganze Dokument -----	20-35

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 01/08715

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9405008 A	03-03-1994	DE 4226868 A1	17-02-1994
		DE 59309190 D1	14-01-1999
		WO 9405008 A1	03-03-1994
		EP 0655162 A1	31-05-1995
		JP 2674634 B2	12-11-1997
		JP 7506690 T	20-07-1995
		US 6274279 B1	14-08-2001

International Publication No. WO 02/10207 A2/A3

Job No.: 1745-95149

Ref.: WO 02/10207

Translated from German by the Ralph McElroy Translation Co.
910 West Avenue, Austin, Texas, 78701

INTERNATIONAL PATENT OFFICE
WORLD ORGANIZATION FOR INTELLECTUAL PROPERTY

International patent published on
the basis of the Patent Cooperation Treaty (PCT)
INTERNATIONAL PUBLICATION NO. WO 02/10207 A3

International Patent Classification ⁷ :	C 07 K 14/215 C 12 N 15/31 G 03 C 1/73 G 11 B 7/24
International Filing No.:	PCT/EP01/08715
International Filing Date:	July 27, 2001
International Publication Date:	February 7, 2002
Language of Submission:	German
Language of Publication:	German
Priority	
Date:	July 27, 2000
Country:	DE
No.:	100 36 745.3
Date:	September 29, 2000
Country:	DE
No.:	100 48 383.6

PROTON-TRANSLOCATING RETINAL PROTEIN

Applicant (for all Designated States except
US):

MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT
ZUR FÖRDERUNG DER
WISSENSCHAFTEN E.V. [DE/DE]
Generalverwaltung Hofgartenstrasse
8
80539 Munich (DE)

Inventors; and
Inventors/Applicants (only for US):

Dieter Oesterhelt [DE/DE]
Werdenfelsstrasse 17
81377 Munich (DE)

Norbert Hampp [DE/DE]
Schillerstrasse 19
35287 Amöneburg-Rossdorf (DE)

Matthias Pfeiffer [DE/DE]
Deutschhausstrasse 46
35037 Marburg (DE)

Agent:

Grünecker, Kinkeldey, Stockmair &
Schwanhäusser
Maximilianstrasse 58
80538 Munich (DE)

Designated States (national):

AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA,
BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN,
CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ,
EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH,
GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE,
KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS,
LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK,
MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL,
PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK,
SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG,
US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

Designated States (regional):

ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS,
MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG,
ZW), Eurasian Patent (AM, AZ, BY,
KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
European Patent (AT, BE, CH, CY,
DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,
LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI
Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM,
GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE,
SN, TD, TG).

Published

- with International Search Report.
- publication will be repeated if changes to claims are submitted before the end of the allotted period.

Date of Publication of the International Search Report: April 18, 2002

For explanation of the two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Explanatory Notes Pertaining to Code and Abbreviations," given at the beginning of each regular number issue of the Gazette of the PCT.

(57) Abstract: The invention relates to proton-translocating retinal proteins, which have a slower photocycle in comparison to the wild type and whose all *trans* retinal content in both the light-adapted and dark-adapted states does not differ by more than 10 %. The invention also relates to a photochromic composition and to the use of both the proton-translocating retinal proteins and the photochromic composition.

INTERNATIONAL PATENT OFFICE
WORLD ORGANIZATION FOR INTELLECTUAL PROPERTY

International patent published on
the basis of the Patent Cooperation Treaty (PCT)
INTERNATIONAL PUBLICATION NO. WO 02/10207 A2

International Patent Classification ⁷ :	C 07 K 14/195
International Filing No.:	PCT/EP01/08715
International Filing Date:	July 27, 2001
International Publication Date:	February 7, 2002
Language of Submission:	German
Language of Publication:	German
Priority	
Date:	July 27, 2000
Country:	DE
No.:	100 36 745.3
Date:	September 29, 2000
Country:	DE
No.:	100 48 383.6

PROTON-TRANSLOCATING RETINAL PROTEIN

Applicant (for all Designated States except
US):

MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT
ZUR FÖRDERUNG DER
WISSENSCHAFTEN E.V. [DE/DE]
Generalverwaltung Hofgartenstrasse
8
80539 Munich (DE)

Inventors; and
Inventors/Applicants (only for US):

Dieter Oesterhelt [DE/DE]
Werdenfelsstrasse 17
81377 Munich (DE)

Norbert Hampp [DE/DE]
 Schillerstrasse 19
 35287 Amöneburg-Rossdorf (DE)

Matthias Pfeiffer [DE/DE]
 Deutschhausstrasse 46
 35037 Marburg (DE)

Agent:

Grünecker, Kinkeldey, Stockmair &
 Schwanhäusser
 Maximilianstrasse 58
 80538 Munich (DE)

Designated States (national):

AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA,
 BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN,
 CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ,
 EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH,
 GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE,
 KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS,
 LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK,
 MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL,
 PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK,
 SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG,
 US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

Designated States (regional):

ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS,
 MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG,
 ZW), Eurasian Patent (AM, AZ, BY,
 KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
 European Patent (AT, BE, CH, CY,
 DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,
 LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI
 Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM,
 GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE,
 SN, TD, TG).

Published

- without International Search Report, and to be published again after receipt of the Report.

For explanation of the two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Explanatory Notes Pertaining to Code and Abbreviations," given at the beginning of each regular number issue of the Gazette of the PCT.

(57) Abstract: The invention relates to proton-translocating retinal proteins, which have a slower photocycle in comparison to the wild type and whose all *trans* retinal content in both the light-adapted and dark-adapted states does not differ by more than 10 %. The invention also relates to a photochromic composition and to the use of both the proton-translocating retinal proteins and the photochromic composition.

The invention concerns a proton-translocating retinal protein, a photochromic composition containing the proton-translocating retinal protein, and the use of the proton-translocating retinal protein and the composition.

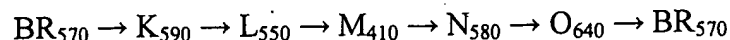
Halobacteria are Archaea that form a third domain of life in addition to Bacteria and Eukarya. Archaea owe their name to the unusual biotopes in which they occur. They frequently live under "archaic" conditions, i.e., at extreme temperatures, salt concentrations or pH values, such as could have been predominant on the early earth's surface.

The halophilic Archaea include 9 genera (for example *Halobacterium*, *Haloferax*, *Natronomonas*, etc.) and are absolutely extremophilic, i.e., they live in salt solutions whose concentrations range from 2M up to saturation and that, in many cases, also have alkaline pH values to pH 11. The halobacteria are part of a complex ecosystem in nature. The increasing salinity under permanent insolation in salt recovery plants or the conditions that prevail in the Dead Sea and other natural hypersaline waters enables, after the annual rain showers, first the photolithotrophic growth of the halotolerant green algae *Dunaliella parva* up to a salt content of about 12%. *Dunaliella* dies after the optimum conditions for it have been exceeded and this enables the massive growth of halophilic Archaea, which frequently leads to the water turning red because of the carotenoid content of the Archaea.

Besides fermentation and aerobic and anaerobic respiration, the halophilic Archaea have an additional possibility for energy conversion, which is unique among the Archaea: they can take up energy and convert it by means of retinal-dependent photosynthesis. In contrast to green chlorophyll-dependent photosynthesis, in this case only a single protein participates in the energy uptake and conversion, namely a light-driven proton-translocating retinal protein.

The best known example of such a proton-translocating retinal protein is the archebacterial proton pump bacteriorhodopsin (BR), which uses light energy directly to produce an electrochemical proton gradient that is converted to chemical energy. Bacteriorhodopsin is an intrinsic membrane protein with a molecular weight of about 26 kDa. The polypeptide chain crosses the membrane seven times, and in this way forms a secondary structure of seven helical transmembrane regions. A retinal (vitamin A aldehyde) is covalently bonded at the side chain of a lysine of the seventh helix within the protein. The resulting CH=N group is called a Schiff base (SB), and in the starting state is protonated at the nitrogen (SBH). The work of Haupts et al. gives an overview of bacteriorhodopsin (Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 28, 367-99, 1999).

The chromophore absorbs yellow-green light maximally at 570 nm, so that BR appears violet to the human eye. After absorption of a photon, the protein undergoes chemical and structural changes that lead to different spectroscopically measurable intermediates. They are designated by the letters K, L, M, N and O and in each case are noted with the wavelength of the maximum absorption in a subscript. The cycle can be written in simplified form as follows:



To date, bacteriorhodopsin is the only retinal protein that occurs in nature in the form of a two dimensional crystal. In a bacterium, the crystals are localized in the so-called purple membrane. The organization in the purple membrane stabilizes the protein to an extent such that it has been proposed for a number of industrial applications (summarized in Oesterhelt et al., Quarterly Rev. Biophysic 24, 425-478, 1991). Here it is possible to utilize the changes of the pH values of the solution, the electrical voltage and the color that arise upon exposure to light.

For instance, the color change from the violet of the bacteriorhodopsin in the starting state BR_{570} to yellow in the intermediate M_{410} is the basis for applications in optical information technology. The decomposition of the intermediate M_{410} , which has a lifespan of a few milliseconds, is the rate-determining step in this cycle. The light intensity and the thermal decomposition constant of the M intermediate determine the ratio of the colors violet and yellow in the photocycle.

In the dark, the retinylidene part of bacteriorhodopsin occurs as a mixture of all-trans, 15-anti and 13-cis, 15-syn configuration in a ratio of about 60:40. It is exclusively the all-trans form of the chromophore that mediates the physiological process of the proton translocation and passes through the yellow intermediate M_{410} ("trans-cycle"). The absorption of photons in the 13-cis configuration does lead to a cycle of color changes, the "cis-cycle," but this differs from the "trans-cycle" in that no yellow M-like intermediate is formed. From the "cis-cycle," the molecule jumps to the "trans-cycle" with very low probability upon exposure to light. This change from "cis-cycle" to "trans-cycle" is called a light adaptation of the dark-adapted form. In practice, this means that after a sample has been kept in the dark (dark adaptation), an initial exposure to light leads only to about 60% of the theoretically possible M intermediate. Through further exposure to light, the sample gradually adapts (light adaptation), so that in the end all molecules are converted to the "trans-cycle" and pass through the M intermediate.

The change of a molecule from the "cis-cycle" to the "trans-cycle" leads to a shift of the absorption peak by several nm and means a considerable disadvantage for the use of bacteriorhodopsins in the preparation of photochromic products, for example optical films or printing inks.

For this reason it would be desirable to produce proton-translocating retinal proteins whose absorption peak in the dark-adapted state corresponds as precisely as possible to that in

the light-adapted state. Beyond that, it would be advantageous if the stability of the M intermediate could be increased in order to be able to observe the color change of the molecule in "trans-cycle" from violet to yellow as precisely as possible.

In accordance with the invention, a proton-translocating retinal protein is now made available that is chosen from the group of:

(i) muteins of a natural proton-translocating retinal protein from halophilic Archebacteria that have a slowed photocycle (type 1 mutation) and whose all-trans retinal content in light- and dark-adapted states deviate from each other by no more than 10% (type 2 mutation) and/or

(ii) homologs of muteins (i) with slowed photocycle, whose retinal isomer composition in light- and dark-adapted states deviate from each other by no more than 10%.

A mutein is understood to mean a proton-translocating retinal protein modified by substitution, deletion or insertion. Muteins can have one or more mutations. Type 1 mutations lead to a reduction of length of the photocycle compared to natural retinal protein from *Halobacterium salinarum* (SEQ ID No. 1). The measurement of a photocycle takes place as described, for example, by Miller and Oesterhelt, Biochem. Biophys. Acta 1020, 57-64, 1990. Type 2 mutations lead to an elevated constancy of the all-trans retinal content in light- and dark-adapted proteins in comparison to the natural retinal protein from *Halobacterium salinarum* (SEQ ID No. 1). The all-trans retinal content in this case is determined as described by Tittor et al., Biophys. J. 67, 1682-1690, 1994. The percent data refer to the total content of the retinal isomers that can be determined by the said method. Normally, type 1 mutations and type 2 mutations of different amino acids are concerned. However, it is also possible that a single mutation has both desired effects and therefore is classified as both type 1 and type 2 mutations. To the extent that naturally occurring archebacterial proton-translocating retinal proteins have a slowed photocycle in comparison to the best known proton-translocating retinal protein, i.e., bacteriorhodopsin from *Halobacterium salinarum* (SEQ ID No. 1) and their all-trans retinal content in light- and dark-adapted states deviate from each other by no more than 10%, they are likewise considered to be muteins within the scope of this invention.

The term "homolog," which is familiar to the specialist, indicates a relationship between two or more peptides, polypeptides or proteins that can be determined by the correspondence between the sequences by means of known methods, for example computer-supported sequence comparison (Basic local alignment search tool, S.F. Altschul et al., J. Mol. Biol. 215 (1990), 403-410). The percent of identity results from the percentage of identical regions in two or more sequences, taking gaps and other sequence peculiarities into account. As a rule, special computer programs with algorithms that take into account the special requirements are used.

Preferred methods for determining homology first generate the greatest correspondence between the tested sequences. Computer programs for determining the identity between two

sequences comprise, but are not limited to, the GCG program package, including GAP (Deveraux, J., et al., *Nucleic Acids Research* 12 (12):387 (1984); Genetics Computer Group University of Wisconsin, Madison, (WI)); BLASTP, BLASTN, and FASTA (Altschul, S. et al., *J. Mol. Biol.* 215:403-410 (1999)). The BLASTX program can be obtained from the National Center for Biotechnology Information (NCBI) and from other sources (BLAST Handbook, Altschul S., et al., NCB NLM NIH Bethesda MD 20894; Altschul, S., et al., *Mol. Biol.* 215:403-410 (1990)). Also, the well-known Smith Waterman algorithm can be used to determine the percent of identity.

Preferred parameters for the amino acid sequence comparison include the following:

Algorithm: Needleman and Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48:443-453 (1970)

Comparison matrix BLOSUM 62 from Henikoff and Henikoff, *PNAS USA* 89 (1992), 10915-10919

Gap Penalty: 12

Gap Length Penalty: 4

Threshold of Similarity 0

The GAP program is also suitable for use with the said parameters. These parameters are the default parameters for amino acid sequence comparison, where gaps at the ends do not change the value. The invention therefore also includes fusion proteins, i.e., proton-translocating retinal proteins with a fusion protein fraction. In the case of very short sequences in comparison to the reference sequence, it can additionally be necessary to increase the expectation value up to 100,000 and, optionally, to reduce the word size to 2.

Other exemplary algorithms, gap opening penalties, gap extension penalties, comparison matrices can be used, including those known in the Program Handbook, Wisconsin Package, Version 9, September 1997. The choice is dependent on the comparison to be made and is further dependent on whether the comparison is carried out between sequence pairs, where GAP or Best Fit are preferred, or between a sequence and an extensive sequence databank, where FASTA or BLAST are preferred.

A correspondence of 40% determined by the above algorithm is characterized within the scope of this application as 40% identity. The same thing is true for higher percentages.

Surprisingly, it turns out that the combination of a type 1 mutation and a type 2 mutation in a proton-translocating retinal protein in accordance with the invention can lead to far-reaching constancy of the all-trans retinal content and to slowing of the photocycle. The all-trans retinal content of the dark-adapted form of the proton-translocating retinal protein in accordance with the invention, as a rule, differs from that of the light-adapted form by no more than 10%. In preferred embodiments, the differences are even smaller and are a maximum of 8 or even a maximum of 5%. Surprisingly, it additionally turns out that it is, in particular, mutants whose

all-trans retinal content does not differ significantly in light- and dark-adapted states, i.e., it does not differ by more than 10%, have an all-trans retinal content of at least 60% in light- and dark-adapted states. This unexpected side effect is extremely advantageous, since any increase of the fraction of the molecules that participate in the "trans-cycle" upon exposure to light lead to a clearer change of color and thus to an improvement of the optical properties.

In accordance with the invention, muteins that have a constant all-trans retinal content in the range of at least 60 to 100%, preferably 62% or 65% up to 100%, are made available. While most retinal proteins have an all-trans retinal content in the range of 60 or 65% to 85%, especially preferred embodiments provide an all-trans retinal content of at least 70% or 75%, at best even 80% to 100%.

In a preferred embodiment, the natural proton-translocating retinal protein, whose mutein(s) have the properties noted*above, is an archebacterial bacteriorhodopsin, for example a halobacterial rhodopsin, preferably bacteriorhodopsin (SEQ ID No. 1) from *Halobacterium salinarum*.

The proton-translocating retinal protein in accordance with the invention includes muteins with a type 1 and a type 2 mutation, whose amino acid sequence has at least 40% identity with the amino acid sequence SEQ ID No. 1. In other embodiments the identity is at least 50, 60 or 70%. In an especially preferred embodiment, the identity is at least 80, 90 or 95%.

In another preferred embodiment, the proton-translocating retinal protein is a homolog with an amino acid sequence that, in the region of the C-helix and/or the F-helix, has an identity of at least 60% with the corresponding amino acid sequences of the mature bacteriorhodopsin from SEQ ID No. 1. In other preferred embodiments, the percentage of identity for the C-helix and/or the F-helix is at least 70, 80 or 90%, preferably at least 95%. The degree of identity for the C- and the F-helices can be the same or different.

The photocycle of the proton-translocating retinal protein in accordance with the invention is slowed by the type 1 mutation. The thermal cycle time in any case is more than 10 msec, preferably more than 1 sec or even more than 10 sec. In especially preferred embodiments, the thermal cycle time lies in the minute range, i.e., it is more than 1 min, while in other preferred embodiments it is even more than 5 or 10 min. In an extreme case, the thermal cycle time can be up to 2 h, but as a rule it is not more than 90 or 60 min.

The type 1 mutation of the proton-translocating retinal protein can consist of an amino acid exchange at one or more of the amino acid positions that participate in the catalytic cycle in the natural protein. This invention includes, therefore, retinal proteins in which one or more positions of the amino acids that participate in proton-translocation, from the group of the amino acid residues D38, R82, D85, D96, D102, D104, E194 and/or E204 in accordance with SEQ ID No. 1 or their corresponding amino residues in homologous proteins, has been modified. A

preferred amino acid exchange is D96N, i.e., the amino acid D in position 96 of SEQ ID No. 1 or the corresponding amino acid in a homologous protein is replaced by N. Other preferred amino acid exchanges are D38R and D102R and/or D104R.

The type 2 mutation of the retinal proteins in accordance with the invention leads to an amino acid exchange at one or more of the amino acid positions that form the retinal binding pocket, and/or immediately adjacent positions. The retinal binding pocket is understood to be the sum of the amino acids that give the Schiff bases of the retinals their characteristic chemical and physical properties. The amino acids that form the retinal binding pocket or immediately adjacent amino acids are chosen from the group of the amino acid residues Val49, Ala53, L93, Met118, Gly122, S141 and Met 145 in accordance with SEQ ID No. 1, or their corresponding amino acid residues in homologous proteins. In preferred embodiments, the type 2 mutation is V49A, V49G, V49F, L93A, G122K, G122C, G122M, S141A, S141M, M145I, M145F, M145W, M145C or M145K. These type 2 mutations surprisingly bring about a constancy of the all-trans fraction in the retinylidene part of the bacteriorhodopsin in light- and dark-adapted states.

The absorption maxima and retinal isomer ratios of the *Halobacterium salinarum* wild type (WT), the pure type 1 mutant D96N, the pure type 2 mutants M145F and L93A and the retinal proteins D96N-M145F and D96N-L93A in accordance with the invention are indicated in the following table:

① Stamm	λ_{max} in nm		Isomere ②			
	DA	HA	DA		HA	
			all-trans	13-cis	all-trans	13-cis
WT	560	568	60	40	98	2
D96N	560	569	54	46	96	4
M145F	558	559	72	28	86	14
D96N-M145F	560	560	66	34	57	33
L93A	541	541	80	20	82	18
D96N-L93A	544	544	80	20	81	19

③ Anm.: „DA“ bedeutet „Dunkel-adaptiert“
 „HA“ bedeutet „Hell-adaptiert“

Key: 1 Strain
 2 Isomer
 3 Note: "DA" means "dark-adapted"
 "HA" means "light-adapted"

Especially preferred combinations of type 1 and type 2 mutations are, for example, V49A-D96N, L93A-D96N and M145F-D96N (see Figure 1).

In another embodiment, the retinal proteins in accordance with the invention are in membrane-bound form, where the membrane has a density between 1.10 and 1.20 g/cm³. In a preferred embodiment, the density is between 1.175 and 1.185 g/cm³. The form of a purple membrane with a density of 1.18 g/cm³ is especially preferred.

Further, nucleic acids that code for the above described retinal proteins are made available in accordance with the invention. These nucleic acids can be produced, on the one hand, by mutations of already known genes for proton-translocating retinal proteins, for example, the gene that codes for the bacteriorhodopsin from *Halobacterium salinarum* (Dunn et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 6744-6748, 1981), and on the other hand, they can be prepared completely synthetically by known methods. Since the genetic code of the Archaea does not differ from that of the Prokarya and Eukarya, nucleic acids intended for transformation in halobacteria can also be produced by the known rules. The specialist will of course make the effort to take into account codon usage matched to the host organism that is called for in each case. The nucleic acids in accordance with the invention can be ribonucleic acids and/or deoxyribonucleic acids.

Further, in accordance with the invention, vectors that include nucleic acids that code for the proton-translocating retinal proteins are made available. In each case, according to the host organism intended for this vector, the specialist will choose between Archebacterial vectors, vectors for expression in Prokarya (*E. coli*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Klebsiella* etc.) or Eukarya (yeasts, animal cell cultures (CHO, HeLa, COS, etc.), plants or plant cells, insects).

Further, in accordance with the invention, a host cell that contains a nucleic acid that codes for a proton-translocating retinal protein in accordance with the invention or a vector in accordance with the invention is made available. The host cells are, for example, Archaea, preferably halobacteria, especially preferably *Halobacterium salinarum*, the transformation of which has been described (Cline et al., Can. J. Microbiol. 35, 148-152, 1989). Alternatively, vectors in accordance with the invention can also be expressed in *E. coli* or other prokaryotic hosts, if needed, even in the above-mentioned eukaryotic cells.

In addition, in accordance with the invention, a photochromic composition that can contain stabilizers, additives that reduce foam formation and/or that absorb UV light, and/or buffer substances in addition to a proton-translocating retinal protein in accordance with the invention are made available.

The photochromic composition in accordance with the invention can contain, for example, glycerol, organic polymers and/or organic solvents.

The proton-translocating retinal protein or the photochromic compositions that contain them can be used to produce optical films. The preparation of optical films from bacteriorhodopsin is already known and described in detail, for example, in Hampp et al., SPIE 3623, 243, 1999. An optical film produced using the proton-translocating retinal proteins in accordance with the invention is suitable for optical recordings. Another possibility for using such optical films is with interferometry or in holographic pattern recognition. The use of optical films as optical light modulators is also possible. Beyond that, the preparation of high density storage means for optical data storage is conceivable (Birge, Scientific American, 1995, 66).

In addition, this invention makes available the use of a proton-translocating retinal protein and/or a photochromic composition as a security dye. In a first embodiment, the retinal protein and/or the photochromic composition are applied to a document or an object that requires security protection. In another embodiment, the photochromic composition in accordance with the invention (or the retinal protein) that has been applied to the document or object requiring protection can be affixed to the document or object.

Affixing in accordance with this invention can be brought about by physical enclosure or covalent coupling to the document. In accordance with the invention, the document requiring security protection is, for example, a security paper, an identification card or a banknote. However, any other document that has a need for security protection can be considered as a document in accordance with the invention.

Finally, this invention makes available a method for producing documents with a security mark, which is characterized by the fact that before, during or after the preparation of the document in the usual way, a proton-translocating retinal protein in accordance with the invention or a photochromic composition in accordance with the invention is applied to it and optionally affixed to it.

The following figures and examples illustrate the invention.

Figure 1 shows the absorption spectra of various proton-translocating retinal proteins in accordance with the invention in comparison to the spectrum of the wild type or of mutants with only one mutation. The solid line in each case shows the absorption spectrum in light-adapted state and the broken line shows the spectrum in dark-adapted state. In particular:

- Figure 1A. Wild type *Halobacterium salinarum* with the amino acid sequence of SEQ ID No. 1. The absorption maximum in light-adapted state is at 568 nm, while in dark-adapted state it is 560 nm.
- Figure 1B. Absorption spectrum of type 1 mutant D96N. The absorption maximum shifts from 569 nm in light-adapted state to 560 nm in dark-adapted state.
- Figure 1C. Type 2 mutant V49A. The absorption maximum in light-adapted is at 549 nm.

- Figure 1D. Retinal protein in accordance with the invention with the double mutation V49A-D96N. The absorption maximum of 559 nm in light-adapted state is shifted by 2 nm to 557 nm in dark-adapted state.
- Figure 1E. Type 1 mutation L93A. The absorption maximum is at 541 nm in light-adapted and dark-adapted states.
- Figure 1F. Retinal protein in accordance with the invention with the double mutation L93A-D96N. The absorption maximum is at 544 nm in light-adapted and dark-adapted states. This double mutant achieves an all-trans fraction of more than 80% in dark-adapted state.
- Figure 1G. Type 2 mutation type M145F. The absorption maximum is at 559 nm in light-adapted state and at 558 nm in dark-adapted state.
- Figure 1H. Retinal protein in accordance with the invention with the double mutation D96N-M145F. This double mutant achieves an all-trans fraction of 66% in dark-adapted state; the adsorption maximum is at 560 nm for the light-adapted and for the dark-adapted retinal proteins.

Example 1

Preparation of a photochromic composition

For preparation of a photochromic composition, the individual proton-translocating retinal proteins are first obtained either from natural halobacteria populations or recombinantly by transformation of *Halobacterium salinarum* (Cline & Doolittle, J. Bact. 169, 1341-1344, 1987) by point-specific mutagenesis of the bacteriorhodopsin gene (Dunn et al., Proc. Natl., Acad. Sc., USA 78, 6744-6748). The purple membrane of the transformed halobacteria is isolated and purified by known procedures (Oesterhelt & Stoeckenius, Meth. Enzym. 31, 667-678, 1974). The method described in German Patent Application 199 45 798.0 can be used to recover bacteriorhodopsin on a large scale.

Example 2

Affixing the photochromic composition on a surface

The photochromic composition in accordance with the invention can, for example, be physically enclosed in a matrix material. Specifically, for example, 10 mg purple membrane containing bacteriorhodopsin D96N/M145F are uniformly suspended in 4 mL of a UV-hardening dye (IFS 3000, Schmitt) and applied to the document that requires security protection. After exposure of a document marked in this way to UV light (according to the manufacturer's instructions), the purple membrane particles are situated in the hardened plastic.

Example 3

Application of the photochromic composition by various methods

Screen Printing

The principle of screen printing is through printing, similar to a stencil technique. The master consists of a screen fabric, which is provided with a dye-impermeable barrier layer. The image to be printed remains open. The printing takes place by drawing a doctor blade over the screen, which has been filled with ink. The ink is in this way transferred to the underlying substrate. To produce a screen printing ink, 100 mg/mL purple membrane is stirred overnight in a 7.2% PVA solution (Mowiol Type 56-98). When the rheological properties correspond to the standard sample, the resulting mixture can be printed using a standard screen printing machine.

Offset Printing

1 g purple membrane is stirred into 5 mL of an unpigmented ink (Schmitt UFO1) at 50°C. The resulting mixture can be printed using the current offset technique.

Example 4

Preparation of a wear-resistant security mark

Wear-resistance of the photochromic composition can be achieved by laminating the document coated with proton-translocating retinal protein into a film pocket of type GHQ-120TR at a temperature of 90 to 140°C using a hot lamination machine (GPM, Mylam 9).

Example 5

Increasing the UV-resistance of the security mark

To increase the UV resistance of the security mark in accordance with the invention, the photochromic composition can be provided with a UV absorber or a derivative thereof in a concentration of 1 to 30%, preferably 3 to 10% (w/w). Preferred UV absorbers are benzophenone, hydroxynaphthoquinone, phenylbenzoxazole, cinnamic acid esters, sulfonamide and aminobenzoic acid esters.

Claims

1. A proton-translocating retinal protein chosen from the group of:
 - (i) mteins of a natural proton-translocating retinal protein from halophilic Archebacteria that have a slowed photocycle (type 1 mutation) and whose all-trans retinal contents in light- and dark-adapted states deviate from each other by no more than 10% (type 2 mutation) and/or
 - (ii) homologs of mteins (i) with a slowed photocycle, whose retinal isomer composition in light- and dark-adapted states deviate from each other by no more than 10%.

2. A proton-translocating retinal protein according to Claim 1, characterized by the fact that its retinal isomer composition in light- and dark-adapted states consists of at least 60% all-trans retinal.

3. A proton-translocating retinal protein according to Claim 1 or 2, characterized by the fact that the natural proton-translocating retinal protein is an Archaea bacteriorhodopsin.

4. A proton-translocating retinal protein according to one of Claims 1 to 3, characterized by the fact that the Archaea bacteriorhodopsin is a rhodopsin from halobacteria.

5. A proton-translocating retinal protein according to one of Claims 1 to 4, characterized by the fact that the archebacterial rhodopsin is bacteriorhodopsin (SEQ ID No. 1) from *Halobacterium salinarum*.

6. A proton-translocating retinal protein according to one of Claims 1 to 5, characterized by the fact that the homolog has an amino acid sequence that has at least 40% identity with the amino acid sequence SEQ ID No. 1.

7. A proton-translocating retinal protein according to one of Claims 1 to 6, characterized by the fact that the homolog has an amino acid sequence that has at least 60% identity with amino acid sequence SEQ ID No. 1 in the region of the C- and/or F-helices.

8. A proton-translocating retinal protein according to at least one of Claims 1 to 7, characterized by the fact that the photocycle of the muteins with type 1 mutation has a thermal cycle time of more than 10 msec.

9. A proton-translocating retinal protein according to at least one of Claims 1 to 8, characterized by the fact that the type 1 mutation is an amino acid exchange at one or more of the amino acid positions that participate in the catalytic cycle in the natural protein.

10. A proton-translocating retinal protein according to Claim 9, characterized by the fact that the amino acids that participate in the catalytic cycle are chosen from the group that includes the amino acid residues D38, R82, D85, D96, D102, D104, E194 and/or E204.

11. A proton-translocating retinal protein according to at least one of Claims 1 to 10, characterized by the fact that the type 2 mutation is an amino acid exchange at one or more of the amino acid positions that form the retinal binding pocket.

12. A proton-translocating retinal protein according to Claim 11, characterized by the fact that the amino acids that form the retinal binding pocket are chosen from the group that includes the amino acid residues Val49, Ala53, L93, Met118, Gly122, S141 and Met145.

13. A proton-translocating retinal protein according to one of Claims 1 to 12, characterized by the fact that it is a mutein of bacteriorhodopsin from *Halobacterium salinarum* (SEQ ID No. 1) with mutations chosen from the following group:

V49A-D96N; L93A-D96N; M145F-D96N,

or a homolog of such a mutein.

14. A proton-translocating retinal protein according to at least one of Claims 1 to 13, characterized by the fact that the retinal protein is present in the form of a purple membrane.

15. A proton-translocating retinal protein according to Claim 14, characterized by the fact that the density of the purple membrane is between 1.10 and 1.20 g/cm³.

16. A proton-translocating retinal protein according to Claim 15, characterized by the fact that the density of the purple membrane is between 1.175 and 1.185 g/cm³.

17. A nucleic acid coding for a proton-translocating retinal protein according to one of Claims 1 to 13.

18. A vector comprising a nucleic acid according to Claim 17.

19. Host cells containing a nucleic acid according to Claim 17 and/or a vector according to Claim 18.

20. A photochromic composition containing at least one proton-translocating retinal protein according to one of Claims 1 to 16, further containing one or more additives chosen from stabilizers, compositions that reduce foam formation, additives that absorb UV light, and buffer substances.

21. A photochromic composition according to Claim 20, characterized by the fact that it contains glycerol, organic polymers and/or organic solvents.

22. The use of a proton-translocating retinal protein according to at least one of Claims 1 to 16 and/or a photochromic composition according to one of Claims 20 or 21 to produce optical films.

23. A use according to Claim 22, characterized by the fact that the optical film is suitable for optical recording.

24. A use according to Claim 22, characterized by the fact that the optical film is suitable for interferometry.

25. A use according to Claim 22, characterized by the fact that the optical film is suitable for holographic pattern recognition.

26. A use according to Claim 22, characterized by the fact that the optical film is suitable as an optical light modulator.

27. Use of a proton-translocating retinal protein according to one of Claims 1 to 16 to produce high density storage means for optical data storage.

28. Use of a proton-translocating retinal protein according to at least one of Claims 1 to 16 or a photochromic composition according to at least one of Claims 20 or 21 as a security dye.

29. A use according to Claim 28, characterized by the fact that the proton-translocating retinal protein and/or the photochromic composition are applied to a document that requires security protection or an object that requires security protection.

30. A use according to Claim 29, characterized by the fact that the proton-translocating retinal protein and/or the photochromic composition applied to the document or object and/or the photochromic composition are affixed to the document or the object.

31. A use according to Claim 30, characterized by the fact that affixation is brought about by physical enclosure or covalent coupling to the document or the object.

32. A use according to one of Claims 29 to 31, characterized by the fact that the document in need of security protection is a security paper.

33. A use according to one of Claims 29 to 31, characterized by the fact that the document in need of security protection is an identification card.

34. A use according to one of Claims 29 to 31, characterized by the fact that the document in need of security protection is a banknote.

35. A method for producing documents with a security mark, characterized by the fact that before, during or after the preparation of a document in the usual way, a proton-translocating retinal protein according to one of Claims 1 to 16 or a photochromic composition according to one of Claims 17 or 18 is applied and optionally affixed to it.